N° 604

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE DES

LAITS FERMENTÉS

LE LEBEN

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Montpellier

Le 21 Juillet 1899

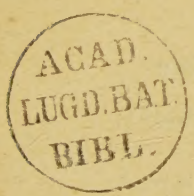
PAR L.-R. ARNOLD

Né à Sétif (Algérie), le 13 Juin 1874

Préparateur d'Histoire Naturelle à l'Ecole de Pharmacie d'Alger

Interne à l'Hôpital Civil de Mustapha

POUR OBTENIR LE GRADE DE PHARMACIEN DE 1re CLASSE



MONTPELLIER

IMPRIMERIE DE LA MANUFACTURE DE LA CHARITÉ

1899

ECOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

Professeurs

MM. L. COURCHET (I. P. ✿)..... *Histoire naturelle des médicaments. Botanique.*
G. MASSOL (I. P. ✿)..... *Physique.*
C. ASTRE (I. P. ✿)..... *Chimie générale.*
JADIN (A. ✿)..... *Pharmacie, chargé de cours.*

Cours complémentaires et auxiliaires

MM. IMBERT, chargé du cours.... *Chimie minérale.*
BELUGOU, chargé du cours.. *Minéralogie et Hydrologie.*
PLANCHON, chargé du cours. *Matière médicale.*
PLANCHON, agrégé..... *Organographie.*
JADIN, agrégé..... *Pharmacie galénique.*
FONZES-DIACON, ch. de c... *Analyse qualitative.*

Agrégés

MM. PLANCHON A. ✿.
JADIN (A. ✿).
IMBERT (A. ✿).
FONZES-DIACON.

Secrétaire..... : H. GOT (I. P. ✿).
Secrétaire honoraire : E.-J. BLAISE (I. P. ✿).

Examinateurs de la Thèse

Président : M. le professeur COURCHET.
Juges : MM. JADIN, agrégé. FONZES-DIACON, agrégé.

NOTA. — L'Ecole de pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats, dans les Thèses ou Syntbèses qui lui sont présentées.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA MÈRE

A MES PARENTS ET AMIS

L.-R. ARNOLD

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur COURCHET

L.-R. ARNOLD

A MON EXCELLENT MAITRE

Monsieur le Docteur TRABUT

PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER
DIRECTEUR DU SERVICE BOTANIQUE DE L'ALGÉRIE
MEMBRE DU CONSEIL SUPÉRIEUR

L.-R. ARNOLD

A MON MAITRE

Monsieur le Docteur SOULIER

PROFESSEUR A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER
SOUS-DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

L.-R. ARNOLD

A TOUS MES MAITRES

DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER

L.-R. ARNOLD

AVANT-PROPOS

Depuis le mémoire de l'Immortel Pasteur sur la fermentation appelée lactique, on a trouvé et étudié bien des ferments du lait et on peut dire que les progrès réalisés dans cette voie sont considérables. Cette étude est cependant loin d'être complète en raison même des difficultés qu'elle présente et surtout en raison du nombre considérable de microbes que l'on rencontre dans le lait. Nous avons donc cru que de nouveaux matériaux, de nouveaux faits apportés à cette étude ne seraient point à dédaigner et s'ils provoquent le moindre intérêt chez nos maîtres nous nous croirons largement récompensé de notre travail.

Le sujet dont nous allons nous occuper est très délicat comme tous ceux de microbiologie. Nous n'avons donc pas la prétention de vouloir l'épuiser complètement mais nous dirons, simplement, brièvement et avec sincérité le résultat de nos recherches, poursuivies pendant une année à l'Institut Pasteur d'Alger, laissant pour plus tard ou à des chercheurs plus autorisés que nous, certaines questions de détail, l'étude complète de chaque microorganisme par exemple, peut-être encore plus délicates mais assurément des plus intéressantes.

Cela dit voici la division de notre travail :

1° Les laits fermentés.

2° Le leben : définition, préparation, composition.

3° Les ferments du leben.

4° Résultat pratique de nos recherches. Préparation d'un leben et usages.

5° Conclusions.

Mais avant d'entrer dans l'exposé de notre sujet qu'il nous soit permis d'adresser ici à nos maîtres de l'Ecole de Pharmacie et de l'Hôpital Civil d'Alger l'expression de notre reconnaissance pour les bons conseils et pour l'enseignement qu'ils nous ont donnés. Que notre

savant professeur d'Histoire naturelle médicale Monsieur le Docteur Trabut, à l'obligeance duquel nous devons le sujet de notre thèse veuille bien accepter l'hommage de notre vive gratitude ainsi que Monsieur le professeur Trolard, directeur de l'Institut Pasteur d'Alger, Nous avons aussi le devoir bien doux de remercier vivement Monsieur le professeur Soulié à qui nous devons nos connaissances en microbiologie, connaissances qui nous ont permis d'aborder cette intéressante question. Nous adresserons aussi nos meilleurs remerciements à nos excellents amis Messieurs Richier et Melis, internes à l'Hôpital Civil. Nous demandons pardon à Monsieur Mélis de faire souffrir sa modestie en disant ici que nous avons mis à contribution ses talents remarquables de dessinateur et que nous sommes très heureux de le reconnaître.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE

DES

LAITS FERMENTÉS

LE LEBEN

LES LAITS FERMENTÉS

« L'homme, à toutes les époques, sous tous les climats, dit M. Duclaux, a recherché avec avidité les boissons fermentées et a honoré comme des dieux ceux qui lui ont appris à les connaître et à les préparer ». Aussi l'usage des liquides fermentés à base de lait remonte à la plus haute antiquité et on peut dire que ces boissons sont nées au milieu des peuples nomades qui habitent l'Asie centrale. Elles ont aujourd'hui conquis droit de cité en Russie où on les utilise en médecine depuis une quinzaine d'années. Récemment elles ont été importées en Autriche, en Allemagne et en France. On en connaît deux : le koumiss et le képhir.

Les Tartares préparent le koumiss avec du lait de jument par addition de koumiss ancien. Suivant la durée de fermentation ils obtiennent du koumiss faible, moyen ou fort, qui renferme respectivement 1, 5 à 6, 12 à 20 p. 100 d'alcool. Il existe en Russie des brasseries de koumiss.

Le képhir est fabriqué par les habitants du haut Caucase avec du lait de vache ou de chèvre. Au lait bouilli ils ajoutent un mélange de saccharomyces cerevisiæ et d'une bactérie spéciale, le diospora caucasica, mélange connu sous le nom de graine de képhir. Comme pour le koumiss on obtient du képhir faible, moyen ou fort.

Le rôle physiologique et thérapeutique de ces boissons a été soigneusement étudié en France. Il ressort de ces intéressants travaux que le koumiss et le képhir sont les aliments les plus digestifs et les plus fortifiants. Aussi sont-ils entrés dans la pratique hospitalière et privée de ces pays et c'est à Paris que M. Dujardin-Baumetz a employé le premier le képhir dans son service à l'hôpital Cochin où il a obtenu d'excellents résultats.

Le leben, lait fermenté, fabriqué en Algérie, doit être rapproché du képhir et du koumiss. Malheureusement il est préparé d'une façon défectueuse et il était nécessaire de pallier à cet inconvénient, en cherchant un mode de préparation simple, économique et à la portée de tout le monde. Pour cela il fallait tout d'abord déterminer la composition du leben, c'est-à-dire en faire l'analyse chimique; puis l'analyse bactériologique s'imposait, car connaissant les éléments de cette boisson il était logique de se demander d'où ils provenaient et quels étaient les microorganismes qui leur avaient donné naissance. Enfin on devait chercher à préparer une boisson identique au leben en associant convenablement les microorganismes trouvés. C'est ce qui fait l'objet de notre modeste travail. Nous avons opéré avec le plus d'exactitude possible, nous défiant avec raison de la théorie et ne prenant pour guide que les principes si féconds de la méthode expérimentale, heureux si les résultats obtenus peuvent être de quelque utilité.

FEMME INDIGÈNE PRÉPARANT LE LEBEN

LE LEBEN

Définition. — Le leben est une boisson particulière préparée par les indigènes en Algérie avec du lait de vache, de brebis, et le plus souvent de chèvre. Ce lait fermenté constitue avec la galette (kesra) d'orge ou de blé et le couscous la base de leur alimentation.

Préparation. — La façon dont se prépare ce breuvage est fort variable mais tous les procédés employés reviennent à peu près à celui-ci.

La femme indigène prend un vase de terre (bougal) qu'elle lave plus ou moins soigneusement à la source voisine en se servant d'une poignée de plantes aromatiques (mentha rotundifolia, mentha pulegium, rosmarinus officinalis, etc.), ou plus simplement d'alfa ou de diss. Elle trait directement dans ce vase qui est ensuite abandonné dans un coin de la hutte (gourbi) ou de la tente (gitoune). Le lendemain le lait est généralement caillé et dans le cas contraire on arrive à ce résultat en le chauffant légèrement. Puis on l'introduit dans une outre en peau de bouc ou de mouton et on agite pendant un temps plus ou moins long, de façon à en séparer une partie du beurre. Dans beaucoup de tribus le lait frais est mis directement dans l'outre où il subit le même traitement. C'est là aussi qu'il subit l'action des microorganismes qui forment un enduit gluant après les parois de l'ustensile.

Ainsi préparé, le leben constitue un liquide blanchâtre, d'une saveur légèrement piquante et non désagréable. Les indigènes qui le préfèrent plus acide y ajoutent une certaine quantité d'eau

et obtiennent ainsi ce qu'ils appellent le leben karse (leben aigre).

L'outre servant à la préparation du leben est nommée chekoua. La peau servant à la confectionner est tannée d'une façon spéciale avec l'écorce du Pin d'Alep, écorce qui est vendue sur tous les marchés algériens sous le nom de *dbara*. Cette écorce est employée après avoir été réduite en poudre et additionnée de sel de cuisine. Pour agiter le leben dans la chekoua, on suspend celle-ci à un support formé de trois perches ou à un arbre et on lui imprime un mouvement de va et vient.

Dans la province de Constantine les indigènes mettent en macération avec de l'eau, la veille du jour où ils doivent préparer le leben, dans le vase en terre ou dans l'outre, la racine fraîche de l'*Atractylis gummifera* (El-Hedad) ou celle du *Carlina involucrata*. Ces plantes sont simplement destinées à parfumer le leben et à le rendre ainsi plus agréable. La racine de l'*Atractylis gummifera* a une odeur balsamique et renferme un principe toxique l'Atractyline. Elle est fréquemment employée par les femmes indigènes pour commettre des empoisonnements (1). Le *Carlina involucrata* possède aussi une odeur balsamique, c'est du reste un genre très voisin de l'Atractylis.

Les restaurateurs indigènes (markadji) vendent à leurs clients sous le nom de leben un simple mélange d'eau et de lait caillé (2). Ce mélange renfermé dans un grand vase en terre, est agité de temps en temps avec un bâton. Ce *modus faciendi* rappelle assez la préparation du koumiss telle que la décrit M. de Lesseps qui dit en parlant des Yacoukes du Kamtchatka :

---

(1) Trabut, *Botanique médicale*.

(2) Au dernier moment nous trouvons dans le *Journal de Pharmacie et de Chimie* (1er juin 1899) l'analyse sommaire d'une thèse de la Faculté française de Beyrouth (Syrie), thèse soutenue par M. Nicolas Georgiadès. L'étude chimique du *laben*, sorte de lait coagulé du pays, en est le sujet. Nous n'avons pas pu nous procurer ce travail. Cependant, d'après ce qu'écrit M. Villejean, dans le *Journal de Pharmacie*, le *laben* de Syrie semble se rapprocher, quant à son aspect et à sa consistance, du leben des restaurateurs indigènes algériens. Il serait intéressant d'en faire une étude comparative.

« Dans un coin de la Yourta est à demeure un baquet de cuir. Chaque jour on y verse du lait de jument qu'on agite avec un bâton pareil à celui qui sert à battre le beurre. Tous ceux qui entrent, les femmes surtout, ne manquent jamais, avant de vaquer à d'autres travaux, de battre ce lait pendant quelques instants ; de là provient cette boisson agréable qu'on nomme le koumouiss. » Veut-on la faire davantage fermenter, elle devient un breuvage des plus capiteux » (Journal, 2e partie, 1798).

Composition. — Nous avons analysé divers échantillons de leben provenant de différents points de l'Algérie, et comme il fallait s'y attendre les résultats obtenus sont assez différents les uns des autres.

Pour faire ces analyses nous avons utilisé les méthodes suivantes :

Acidité. — On prend 50 cc. de liqueur, on distille et on recueille 20 cc. dans lesquels on dose les acides volatils. L'acidité fixe se dose dans le résidu après filtration et lavages convenables. Pour ces dosages on se sert de la solution décinormale de soude avec la phtaléine du phénol comme réactif indicateur. L'acidité fixe est évaluée en acide lactique et l'acidité volatile en acide acétique. Avant chaque opération on ramène au volume primitif au moyen d'eau distillée.

Acide Carbonique. — L'acide carbonique libre et combiné est dosé par perte au moyen de l'appareil de Geissler et Erdnam. On opére sur 10 cc de liqueur saturée par une solution de soude et on déplace l'acide carbonique par addition d'acide sulfurique.

Lactose. — On prend 20 cc de liqueur, ou chauffe pour coaguler l'albumine et agglomérer la caséine en suspension, on filtre, on lave le résidu à l'eau distillée et on ramène au volume primitif. On prélève 10 cc de ce liquide, on étend à 50 cc et on dose à la liqueur de Fehling par la méthode de M. Battandier.

Beurre. — On prend 10cc de liqueur à laquelle on ajoute une certaine quantité de verre pilé. On évapore au bain-marie, on épuise le résidu dans une petite allonge par de l'éther bouillant.

Cette solution éthérée soumise à l'évaporation d'abord à basse température, puis à l'étuve à 100° donne le poids du beurre.

Alcool. — On prend 100 cc de liquide qu'on neutralise par addition d'eau de chaux. On distille et on recueille 50 cc, on ramène au volume primitif avec de l'eau distillée et on prend le degré alcoométrique en tenant compte de la température. On peut se servir aussi du compte-gouttes de M. Duclaux et s'il y a très peu d'alcool on l'apprécie par la réaction de l'iodoforme.

Extrait sec. — On évapore 10 cc de liqueur au bain-marie, on dessèche à l'étuve à 95° jusqu'à poids constant.

Cendres. — On incinère l'extrait sec après l'avoir mélangé à un poids déterminé de carbonate de soude pur et sec. On évite ainsi la perte d'une partie du chlore et du phosphore. Cette précaution est recommandée par MM. Strekder et H. Rose.

Matières Albuminoïdes. — Si du poids de l'extrait sec on retranche le poids de la lactose, celui du beurre et des cendres, on a pour reste le poids des matières organiques extractives. Nous diviserons ces substances en deux groupes : celles en suspension et celles en solution, car dit M. Duclaux : « Nous ne connaissons encore aucune réaction qui appartienne sûrement en propre à une matière albuminoïde et qui soit indépendante des matériaux salins qui les accompagnent d'ordinaire.

Il serait curieux que ne pouvant pas définir ce qu'on appelle matière albuminoïde nous nous octroyions le droit d'en définir plusieurs. Tout ce que nous pouvons faire à propos du lait c'est de distinguer la caséine, en caséine en suspension et en caséine soluble. » (Principes de Laiterie).

Pour faire ce dosage on prend 20 cc de liqueur, on chauffe vers 100° et on filtre sur un filtre taré. Les matières albuminoïdes en suspension et le beurre restent sur le filtre. On dessèche à 25° et on pèse. De ce poids on retranche celui du beurre et on a ainsi le poids des substances organiques extractives en suspension. Pour avoir celui des albuminoïdes en solution il suffit de retrancher le poids des albuminoïdes en suspension de celui des albuminoïdes totaux.

Résultats des Analyses de quelques échantillons de leben

	Orléansville	Blida	Palestro	N'Gaous	Aïn-Guenafet	
Eau	941.3	954.80	952.87	947.82	949.	
Albuminoïdes en suspension .	32.64	18.57	13.46	29.6	16.8	
Albuminoïdes en solution	4.36	2.8	5.2	4.8	2.3	
Beurre.	5.	1.4	2.75	1.7	3.4	POUR 1000
Lactose	13.5	20.15	22.94	12.6	24.5	
Acidité fixe . .	5.5	6.9	7.34	8.02	3.6	
Acidité volatile	0.2	0.15	0.13	0.18	traces	
Cendres	3.	2.7	2.65	3.3	4.	
Extrait sec. . .	58.5	45.	47.	52.	51.	
Alcool	1.2	traces	0.75	1.3	traces	
Acide carboniq.	non dosé	3.	4.5	5.	non dosé	

De l'examen de ces analyses il résulte que la fermentation produite dans le lait a transformé une grande partie de la lactose en acide carbonique, en acide lactique et en alcool. De plus une partie de la caséine est solubilisée et cette solution renferme une certaine quantité de matières albuminoïdes non précipitables par la chaleur et l'acide azotique, c'est-à-dire présente les caractères de ce qu'on appelle peptones. Ces divers éléments proviennent sûrement de l'action de microorganismes que l'analyse bactériologique va maintenant nous faire connaître.

Remarque. — En donnant la composition chimique du koumiss et du képhir, il nous sera possible de la comparer à celle du leben. Voici quelle est cette composition d'après les exemples

choisis par M. Bourquelot dans son travail sur les Fermentations :

	KOUMISS DE 2 JOURS (BIEL)	KÉPHIR DE 2 JOURS	POUR 1000
Eau et sels	943.2	904.097	
Albuminoïdes	22.2	38.	
Matières grasses	12.	20.	
Lactose	13.2	20.025	
Acide lactique	6.5	9.	
Alcool	16.4	8.	
Acide carbonique	8.4	non dosé	

On voit que le sucre de lait est en faible proportion dans le koumiss et qu'il est au contraire en quantité notable dans le képhir et le leben. Pour l'alcool, c'est l'inverse qui a lieu, c'est-à-dire que la quantité en est notable dans le koumiss, tandis qu'elle est plus faible dans le leben et le képhir. Les albuminoïdes et l'acide lactique sont en proportions peu différentes dans les trois boissons. Il résulte de cette comparaison que l'analogie entre le képhir et le leben est assez grande, tandis que tous deux présentent une certaine différence avec le koumiss. Cependant nous devons ajouter que cette comparaison ne saurait être rigoureuse, car elle porte sur des échantillons provenant de laits très différents, ce qui lui enlève beaucoup de sa valeur.

LES FERMENTS DU LEBEN

Procédés de recherche. — Pour étudier un microorganisme il faut en avoir une culture pure, obtenue en se débarrassant des autres germes, des impuretés, par isolement. Les procédés d'isolement employés en bactériologie sont fort nombreux. Nous ne nous arrêterons donc pas à les décrire et nous nous hâterons de dire que nous avons employé la méthode des cultures en milieu solide imaginée par Koch. Cette méthode comporte deux procédés différents : par ensemencements direct en strie ou par ensemencement indirect dans le milieu préalablement liquéfié. Nous avons utilisé le second procédé en nous servant des boites de Pétri et de gélatine ou gelose lactosées. Nous avons opéré trois dilutions différentes de la semence, afin d'avoir un isolement parfait des colonies. Les boites de Pétri ont été placées, les unes à l'étuve, aux températures de 25° et 37°, les autres à la température du laboratoire (15° 20°). Nous les avons examinées tous les jours et pendant 15 jours. Quelques-unes ont été laissées un mois. Nous avons effectué le prélèvement d'un échantillon de chaque colonie pour les réensemencements et l'examen microscopique. Le réensemencement fait nous nous sommes encore assuré de la pureté de la culture par un nouvel examen microscopique et nous avons alors fait les ensemensements dans divers milieux.

Quand on pratique un semblable isolement il est nécessaire de distinguer les germes aérobies des germes anaérobies. Nous nous sommes occupé que des aérobies nous proposant d'étudier plus tard les anaérobies. Nous diviserons ces aérobies en deux groupes : les ferments de la lactote et ceux de la caséine.

Pour étudier le rôle de ces ferments nous nous sommes servis des liquides suivants :

1° Lait stérilisé.

2° Liquide A....	Lactose	5
	Chlorure de Sodium	0.05
	Phosphate bi-potassique	0.10
	— Ammoniaque	0.15
	— chaux (tricalcique)	0.30
	Caseine	2
	Eau distillée	100
3° Liquide B....	Lactose	5
	Peptone	2
	Eau distillée	100

Le lait a été privé de toute trace d'acidité en l'agitant fortement avec du carbonate de calcium pur que l'on élimine ensuite par filtration. Ce lait a été alors stérilisé par la méthode de chauffage discontinu de Tyndall à la température de 100°. Nous avons donné la préférence à cette méthode car le lait stérilisé à 115° ou 130° brunit plus ou moins, perd une partie de ses propriétés et semble ne plus convenir aux microbes qui s'y développent assez difficilement. Nous nous en sommes rendu compte.

Le liquide B a été pris de préférence à tout autre car d'après les remarquables études de M. Kayser sur la fermentation lactique, la peptone est la matière azotée que préfèrent les ferments lactiques (Ann. Institut Pasteur 1894). Le liquide A nous a donné également de bons résultats.

Mais il est utile de dire ici qu'il n'y a pas que le choix de la nourriture qui influe sur la nutrition des bactéries et les propriétés chimiques du substratum peuvent aussi avoir leur influence. On sait en effet que les levures et les moisissures s'accommodent très bien d'un milieu acide tandis que le plus grand nombre des bactéries ne prospèrent que dans un milieu neutre ou légèrement alcalin. La présence d'un acide suffit quelquefois à arrêter ou au moins à ralentir toute végétation ultérieure. « C'est ainsi

que 0,2 pour 100 d'acide lactique empêche le développement du Bacillus subtilis » (De Bary Leçons sur les bactéries). Or le leben renferme en moyenne 0,6 pour 100 d'acidité totale. Le nombre des microorganismes se développant dans ce milieu sera donc forcément limité. Nous avons consulté l'expérience à ce sujet et l'expérience nous a donné raison. Il est heureux qu'il en soit ainsi, car avec la malpropreté manifeste des indigènes, qui ont des notions bien vagues d'hygiène, le leben ne tarderait pas à être en Algérie le véhicule propagateur des maladies infectieuses.

Ferments de la caséine — Le monde des ferments des matières albuminoïdes semble infiniment plus peuplé que celui des substances hydrocarbonées. Leur étude déjà ingrate se complique encore de ce fait que les substances albuminoïdes étant des composées chimiques peu définis il est difficile de dire quels sont les premiers produits de leur destruction par les microbes et partant d'étudier le rôle physiologique de ces derniers. Seuls les derniers termes de cette dislocation moléculaire peuvent être isolés et on sait qu'ils varient avec les microbes entrés en action. En effet et comme le démontrent les intéressantes études de M. Duclaux sur les ferments des matières albuminoïdes, ces infiniments petits donnent tous de la leucine et de la tyrosine, mais il en est qui aboutissent à l'urée tandis que d'autres vont jusqu'au carbonate d'ammoniaque. Avec la caséine, ils donnent des acides gras variables et souvent mélangés. La nature et la proportion de ces résidus peuvent donc fournir quelques renseignements pour la diagnose de tous ces êtres dont la forme est si variable qu'elle ne peut seule servir à les différencier.

Quoiqu'il en soit on peut dire que ces microbes secrètent deux diastases : une présure et une caséase. La présure coagule le lait, la caséase redissout le coagulum.

Nous avons isolé du leben plusieurs ferments de la caséine. Ces ferments à caractère aérobie, produisant des combustions en général trés complexes, doivent certainement se rattacher au groupe des tyrothrix étudiés par M. Duclaux. Il serait nécessaire

d'en faire une étude plus approfondie pour en avoir la certitude. Nous les passerons rapidement en revue en les désignant par les lettres de l'alphabet.

Ferment (a). — C'est un bâtonnet d'une longueur variable, pouvant s'allonger en longs filaments qui s'enchevêtrent et prennent ainsi l'aspect de broussailles.

En culture sur gélatine il donne au bout de 24 heures, et à 20° des colonies nacrées, peu étendues, très dure à l'ose de platine. Finalement la gélatine se liquéfie en donnant naissance à des produits à odeur putride.

Il coagule le lait le 3e jour à 25°. Le coagulum est ensuite redissout avec putréfaction. A 35° les phénomènes sont identiques mais la marche est plus rapide. Dans le même milieu et en tube, la liquéfaction du caillé commence par les couches supérieures ce qui montre bien la vie aérobie du microbe. Les résultats sont les mêmes, quant à la liquéfaction de la caséine et à la putréfaction, avec le liquide A. Avec le bouillon de bœuf peptonisé à 25° et à 35° on obtient un dépôt blanc d'une apparence gélatineuse. La putréfaction a également lieu. Ce ferment n'agit pas sur la lactose.

Ferment (b). — C'est un bâtonnet court. En culture sur gélose il donne des colonies arrondies à bords irréguliers, rougeâtres et très molles. Ensemencé par piqûre il développe une ampoule volumineuse. Il liquéfie la gélatine Dans le lait il donne une légère coloration rouge qui disparaît avec le temps. Dans le bouillon on obtient au bout de 24 heures un léger trouble, puis un précipité blanc pulvérulent. Il n'attaque pas la lactose. Toutes les cultures dégagent une odeur putride.

Ferment (c). Bâtonnet grêle de longueur variable. Il liquéfie la gélatine. Sur gélose il donne des cultures jaunâtres, étendues et molles. Il coagule le lait et redissout le coagulum en donnant un liquide opalescent. Il n'y a pas de putréfaction. Ce lait ainsi digéré renferme une certaine quantité de peptone. Le sucre de lait est respecté.

Ferment (d). — C'est, croyons-nous, l'Oïdium lactis. Nous l'avons trouvé dans tous les échantillons de leben. Il se développe sur tous les milieux, neutres ou acides. Il forme sur le lait une couche veloutée. Examiné au microscope il présente un mycélium avec des ramifications en forme de fourche. Les rameaux mycéliens fructifères se terminent par un chapelet de spores rectangulaires (Fig. 1). Cette fructification est surtout facile à voir quand on ensemence l'oïdium en plaque sur agar-agar lactosé.

Fig. I

L'aspect rectangulaire de ces cellules, qui de plus prennent le Gram, est bien celui des conidies de l'oïdium lactis. Leur longueur est variable, leur largeur est de 5 μ. Ensemencé en profondeur ce ferment se cloisonne en une série d'articles qui s'arrondissent et prennent toute l'apparence de globules de levure. Ils sont cependant plus irréguliers et plus gros, ils ont de 5 à 10 μ de diamètre (Fig. II).

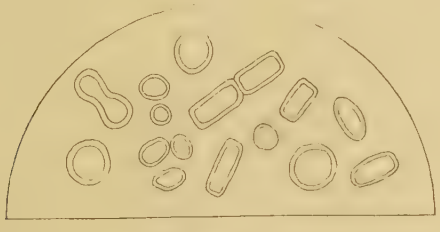


Fig. II

Ce sont bien là les caractères de l'oïdium lactis, comme on le sait c'est un saprophyte du lait. Il est presque exclusivement aérobie. Il vit aux dépens de la lactose ou de l'acide lactique qu'il détruit complètement. Il s'attaque même à la caséine et doit certainement secrèter une caséase très active. Il liquéfie la gélatine avec putréfaction.

Ferments de la lactose. — Les ferments de la lactose sont nombreux. On peut distinguer les ferments lactiques et les ferments alcooliques.

Ferments lactiques. — En dehors des ferments lactiques se rapprochant du type créé par Pasteur c'est-à-dire dédoublant la lactose par hydratation en quatre molécules d'acide lactique d'après l'équation :

$$C^{12} H^{22} O^{11} + H^2 O = 4 (C^3 H^6 O^3)$$

il existe une foule de microorganismes qui donnent, en dehors de l'acide lactique, un mélange d'acide formique, acétique, butyrique etc. Monsieur Kayser a fait une admirable étude comparative de quelques uns de ces ferments étude qui démontre qu'il est difficile d'établir l'équation exacte de la fermentation lactique.

Nous n'avons trouvé qu'un ferment lactique dans le leben et comme on va le voir ses caractères se rapprochent beaucoup du ferment lactique ordinaire pour ne pas dire qu'ils sont indentiques.

Ce sont de courts bâtonnets ayant l'aspect d'haltères aspect qui est très marqué après l'action des colorants par suite de la rétraction du protoplasma aux deux pôles (Fig. III). Leur largeur

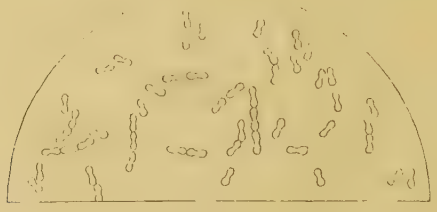


Fig. III

est d'environ 0 μ 6, leur longueur varie entre 1 μ et 2 μ 5. Ils sont généralement isolés et quelquefois en chaines d'un très petit nombre d'articles, par deux la plupart du temps. Sur gélose lactosée ils donnent au bout de 48 heures de petites colonies grisâtres qui ne tardent pas à s'étaler. Sur gélatine l'aspect est le même. A 35° ils cultivent plus rapidement. A cette température ils coagulent le lait en 24 heures en donnant un coagulum ferme et qui ne change pas d'aspect même après quatre mois de culture. Ils ne secrètent donc pas de caséase. A 25° il coagule le lait en 48 heures. L'influence de l'âge de la semence au point de vue de son action sur le lait est considérable, surtout quand le ferment est ensemencé en milieu solide. Il met alors beaucoup plus de temps pour coaguler le lait et même après deux mois de culture il parait inactif.

La stérilisation du lait a aussi son influence. Ainsi avec du lait recueilli aseptiquement au pis de la bête, la coagulation a lieu beaucoup plus rapidement qu'avec du lait stérilisé à l'autoclave. Dans ce dernier cas la coagulation n'a lieu que le 5e ou le 6e jour suivant que le lait a été stérilisé à 100° ou à 120°. Cela n'a rien qui nous surprenne car le chauffage modifie les propriétés du lait et chasse une partie de l'air qu'il renferme. En effet, M. Ch. Richet « a établi que l'oxygène rend plus rapide la fermentation lactique et que l'ébullition du lait, en coagulant une matière albuminoïde soluble, diminue de moitié l'activité de la fermentation » (Dictionnaire de Chimie Wurtz). Ces modifications ne conviennent donc pas au microbe qui préfère le lait cru au lait cuit.

Les quantités d'acide que donne ce ferment varie avec le temps. Dans le lait et le 5e jour, aux températures de 25° et 35°, les quantités d'acide produit sont respectivement 4 gr. 14 et 5 gr. 04 pour 1000, quantités évaluées en acide lactique. Le 30e jour à 15° la quantité d'acide est de 8 gr. 2. Cette quantité d'acide n'est guère dépassée. La fermentation semble cesser là, bien que la liqueur renferme encore de la lactose. Le ferment n'aime pas en effet les liqueurs trop acides. Aussi pour rétablir la fermen-

tation il suffit d'ajouter à la culture du carbonate de chaux pulvérisé qui sature l'acide lactique formé avec dégagement d'acide carbonique suivant l'équation :

$$C^3 H^6 O^3 + CO^3 Ca = CO^2 + (C^3 H^5 O^3)^2 Ca + H^2 O$$

Les indigènes arrivent au même résultat en diluant le leben doux par addition d'eau : c'est ainsi qu'ils préparent le leben " Karse "

D'après ce que nous venons de dire on voit que l'analogie est bien grande entre ce ferment et le ferment lactique ordinaire. Nous les considérerons donc comme identiques puisque aucun fait important nous autorise à les différencier.

Ferments alcooliques. — On a cru pendant longtemps que la lactose était incapable de subir la fermentation alcoolique, c'est-à-dire de se dédoubler en acide carbonique et en alcool. En effet, les levures ordinaires ne peuvent produire cette fermentation. M. Duclaux dit à ce sujet : « On peut considérer comme acquis que la grande majorité, sinon la presque totalité de nos levures usuelles, celles qui fabriquent nos vins et nos bières, sont incapables de faire fermenter la lactose. Elles vivent, mais péniblement, à ses dépens. Elles en transforment une minime partie en alcool, brûlent le reste, et, comme dans toutes les vies aérobies, le poids de levure est une fraction sensible du poids du sucre consommé. »

Mais des expériences de ce savant il ressortait cependant que la lactose pouvait subir la fermentation alcoolique et qu'il ne s'agissait que de trouver une levure appropriée. Cette levure a été découverte et isolée par M. Duclaux en 1887. Depuis, M. Adametz, à l'Institut agronomique de Vienne, en a étudié une seconde, M. Kayser en a aussi retiré une d'un lait d'une ferme de Brie. Ces levures fermentent la lactose aussi facilement que les levures ordinaires fermentent la glucose. Elles donnent de l'alcool vinique à peu près pur et l'acidité du milieu où elles se développent n'est jamais bien élevée. Ces levures ne donnent pas de spores.

Nous avons isolé du leben une levure qui se rapproche beaucoup de ces dernières. Elle présente à l'examen microscopique des cellules rondes ayant de 5 à 7 μ de diamètre (Fig. IV). Ces

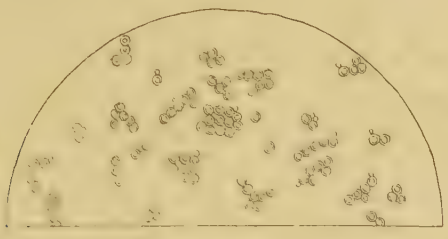


Fig. IV

cellules se développent par bourgeonnement. La membrane de chaque cellule est très apparente après coloration par le bleu de méthyle ou le krystal violet phéniqué. Les vieilles cultures sur agar-agar montrent des cellules avec des gouttelettes graisseuses, brillantes et probablement inertes (Fig. V). Ces goutte-

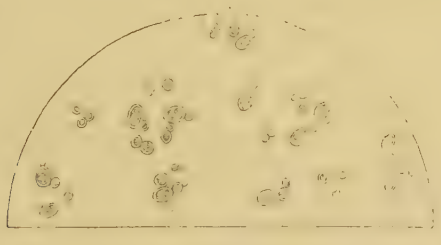


Fig. V

lettes ne doivent pas être confondues avec des endospores. La chaleur en présence d'alcool et d'éther les fait disparaître. Ensemencé en milieu solide, ce ferment forme une véritable zooglée. En milieu liquide, il se répand dans toute la masse en donnant cependant un dépôt grisâtre formé presque en entier de cellules de levures. Nous n'avons jamais observé de voile.

Le développement de ce ferment a lieu dans tous les milieux usuels, sur gélatine et gélose lactosées il forme une couche blanche, épaisse, molle, ne s'étendant pas beaucoup en largeur.

Mais il ne donne pas, comme ceux dont nous avons parlé, de fins rayons auréolés à aspect de mycélium. Dans le bouillon il donne à 35° un dépôt blanc, granuleux et le liquide reste limpide. Il se développe très bien dans le lait qui ne se coagule pas et ne change pas de couleur. Cette levure ne secrète donc ni présure ni caséase. Le liquide devient cependant acide. L'acidité totale peut atteindre 4 millièmes. La chaleur provoque alors la coagulation du liquide. Une trop grande acidité gêne beaucoup l'action du ferment, ce qui explique la présence d'une certaine quantité de lactose dans le leben.

Sous l'influence de l'invertine que secrète probablement cette levure, la lactose est sans doute hydratée et dédoublée en glucose et galactose directement fermentescibles. En négligeant les produits accessoires (acide succinique, glycérine, acide acétique, etc.), qui prennent naissance dans toute fermentation alcoolique, les phénomènes produits peuvent être résumés dans les équations suivantes :

$$C^{12} H^{22} O^{11} + H^2 O = 2\, C^6 H^{12} O^6$$

$$C^6 H^{12} O^6 = 2\, CO^2 + 2\, C^2 H^6 O$$

On observe en effet un dégagement d'acide carbonique et la quantité d'alcool produit varie entre 2 et 2.5 par 100. Cet alcool doit certainement renfermer de très petites quantités d'un éther qui lui donne une odeur agréable.

La fermentation se produit également dans le liquide A et B. La saccharose est aussi fermentée et nous nous en sommes rendu compte par l'expérience suivante : nous avons pris deux tubes renfermant 30 centimètres cubes d'une solution d'un mélange de peptone et de saccharose, les proportions étaient 2 pour 100 de peptone et 5 pour 100 de saccharose. Nous avons stérilisé ces tubes à 120° pendant 20 minutes. Puis nous les avons portés à l'étuve à 25° après ensemencement d'un seul tube, l'autre restant comme témoin. Le 5e jour, le tube témoin n'avait pas changé ; l'acidité de la peptone n'avait donc pas

interverti la saccharose. Le tube ensemencé renfermait de l'alcool et 1 gr. 8 pour 100 d'acidité totale. La levure avait donc sécreté une diastase assez active pour fermenter la saccharose.

Comme on le voit, ce ferment est très intéressant et mérite certainement une étude plus approfondie que celle que nous en avons faite.

Impuretés. — Nous avons isolé quelques autres microorganismes n'agissant ni sur la caséine ni sur le sucre de lait. Leurs colonies étaient du reste très rares. Il est donc fort probable qu'ils n'étaient là qu'accidentellement et il n'y a pas lieu de nous en occuper davantage.

RÉSULTAT PRATIQUE DE CES RECHERCHES

Préparation d'un Leben et usages

Ces recherches nous montrent qu'il est possible d'obtenir avec le lait ce que nous obtenons avec certains jus sucrés c'est-à-dire une liqueur fermentée. Nous allons donner quelques modes de préparation pratique de lait fermenté, de leben, modes qui nous ont donné des résultats satisfaisants. Dans les procédés que nous allons indiquer il est absolument indispensable de recueillir du lait, non d'une façon rigoureusement aseptique, ce qui est trop délicat pour être pratique, mais du moins avec la plus grande propreté possible. Les ustensiles servant à le recueillir devront au moins être passés à l'eau bouillante.

Premier procédé. — On ensemence le lait avec le ferment alcoolique et on abandonne à la température ordinaire. La fermentation commence généralement le deuxième jour et est de plus en plus active. Vers le 4e ou 5e jour on peut mettre le liquide dans des bouteilles en ayant soin de ficeler le bouchon. On obtient ainsi une boisson assez agréable, pétillante grâce à l'acide carbonique qu'elle renferme et ayant toute l'apparence du lait. La lactose reste encore en proportion notable du moins le 5e jour et la quantité d'alcool produit est en moyenne 2 p. %. L'acidité totale varie entre 3 et 4 pour 1000.

Second procédé. — On ensemence le lait avec le ferment alcoolique, le ferment lactique et le ferment (c) de la caséine. On abandonne à la température ordinaire. Le troisième jour on obtient du leben doux. Si on met ce leben dans des bouteilles

en verre épais, que l'on bouche soigneusement en assujettissant le bouchon à l'aide d'une ficelle, on obtient au bout de peu de temps un véritable champagne lacté dont la saveur est aigrelette et agréable. Il faut avoir le soin d'agiter de temps à autre le liquide afin de le rendre plus homogène. Par le repos il se sépare en deux couches, une inférieure caséeuse et une supérieure blanchâtre. Ce leben laissé longtemps en bouteille devient trop acide mais alors il y a un moyen fort simple de remédier à cet inconvénient. Il suffit de mettre 25 grammes de phosphate bicalcique par litre de leben, au moment où on le met en bouteilles. Ce phosphate sature peu à peu l'acide lactique formé en donnant du lactophosphate de chaux qui vient ainsi augmenter les propriétés médicamenteuses du produit.

Le leben préparé de cette façon ne renferme que des traces d'alcool. Il doit certainement se passer entre le ferment lactique et le ferment alcoolique un phénomène symbiotique qui est peut-être l'inverse de celui qui se passe dans le Képhir c'est-à-dire qu'ici ce serait la levure qui dédoublerait la lactose au profit de son associé. Cette question a son importance et mérite une étude particulière que nous nous proposons de faire plus tard. Quoiqu'il en soit ce leben renferme à peu près la moitié de sa caséine en solution et l'autre en suspension à l'état de grumeaux absolument ténus. Il renferme un peu de caséone analogue à ce que l'on nomme peptone. La caséone serait d'après M. Duclaux, le résultat de l'action de la caséase sur la caséine. La quantité de beurre est la même que celle renfermée dans le lait employé. On peut du reste écrêmer le lait avant de lui faire subir la fermentation. Le degré d'acidité est variable avec le temps. Le sixième jour l'acidité fixe est en moyenne 5 gr. ponr 1000 évaluée en acide lactique et l'acidité volatile 1 gr. 50 évaluée en acide acétique. La quantité de lactose restant varie beaucoup aussi, le douzième jour elle est en moyenne de 9 grammes par litre.

Usages. — Le lait, on le sait, est plus ou moins bien accepté par les personnes malades et même par les personnes en bonne santé. Son principal inconvénient est de former dans l'estomac,

surtout lorsqu'il est bu trop vite, des coagulums volumineux que celui-ci supporte avec peine et se débarrasse assez difficilement. Le lait occasionne ainsi une gêne manifeste qui se traduit quelquefois par des vomissements. Cette coagulation du lait est produite chez l'adulte par le suc gastrique acide et chez l'animal en lactation par la présure secrétée par la muqueuse stomacale. Mais le lait ne subit dans l'estomac aucune autre transformation, sa digestion s'opère ailleurs : c'est l'œuvre du pancréas. Celui-ci secrète une caséase qui rend la caséine soluble et cette action est d'autant plus rapide que la caséine se présente en particules plus petites ou mieux en solution. Le ferment *(c)* secrète aussi une caséase identique à celle secrétée par le pancreas. Il est donc légitime de se servir de ce microorganisme et de le faire travailler pour nous — il y en a tant qui travaille contre — en réalisant ainsi une économie de suc pancréatique. La caséone que renferme le leben est l'œuvre de son activité digestive. Cette caséone est en quantité très minime car le ferment *(c)* n'aime pas les milieux acides, et le leben est acide. Ce dernier en arrivant dans l'estomac ne craint pas comme le lait la coagulation pour la raison bien simple qu'elle s'est déjà produite Une partie des albuminoïdes est solubilisée et le reste est en flocons, si petits, si délicats que l'estomac n'a plus aucun effort à faire pour le désagréger. Le leben ne provoque donc pas comme le lait après son ingestion, cette sensation désagréable de pesanteur ressentie par beaucoup de personnes qui en font usage. De plus il renferme de l'acide lactique, de l'acide carbonique, de la lactose et de l'alcool. Or, d'après un savant russe, Jerusalinski, l'acide lactique est un hypnotique. Il est encore utilisé pour combattre la diarrhée verte infantile de nature microbienne. On l'a préconisé dans le diabète sucré et comme prophylactique des attaques de goutte. Comme nous l'avons déjà proposé, on peut dans le leben, combiner cet acide au phosphate de chaux et le lactophosphate de chaux produit vient apporter sa part d'influence heureuse. L'acide carbonique agit sur la muqueuse de l'estomac comme anesthésique et comme stimulant des vais-

seaux capillaires. Quant au sucre de lait, c'est un diurétique puissant, fréquemment utilisé aujourd'hui. Est-il besoin d'insister sur les propriétés bienfaisantes de l'alcool pris en petite quantité et ainsi dilué dans le leben. C'est un aliment d'épargne qui agit favorablement sur la circulation du sang et sur le système nerveux.

Le leben d'après ce que nous venons de dire est un aliment digestif et fortifiant. C'est de plus un médicament et son analogie avec le Képhir nous amène à citer deux observations faites au sujet du lait fermenté. M. Dujardin-Baumetz dit que « c'est un tonique puissant qui permet surtout d'instituer chez un alcoolique atteint de catarrhe de l'estomac une médication lactée qui ne le prive cependant pas brusquement d'alcool, privation, qui, comme on sait, dans certains cas, peut déterminer l'apparition de symptômes graves. C'est en mot l'intermédiaire utile entre l'alimentation habituelle de l'ivrogne et la diète exclusivement lactée. »

Monsieur le professeur Dr Huguenin de Zurich dit : « J'ai institué au moyen du Képhir une série d'expériences qui ont porté sur les affections stomacales, deux sujets entre autres, atteints d'une dilatation de l'estomac, arrivèrent par l'emploi exclusif du Képhir, à pouvoir de nouveau absorber n'importe quelle nourriture. Dans le cas de cancer stomacal, le Képhir s'est manifesté comme le meilleur remède à ordonner. »

Le leben peut répondre, croyons nous, à toutes les application thérapeutiques du Képhir, et comme tel mérite d'être utilisé. Nous espérons donc qu'il rendra quelques services et ce sont là tous nos vœux, c'est là notre humble espoir.

CONCLUSIONS

Nos conclusions ressortent de notre travail que nous pouvons résumer de la façon suivante.

1° Le leben est un lait fermenté analogue au Képhir et au Koumys.

2° Cette boisson est préparée par les indigènes en Algérie mais d'une manière défectueuse. Nécessité de trouver un mode de préparation rationnel.

3° L'analyse chimique du leben nous montre que sa composition est très variable et qu'il renferme de l'acide lactique, de l'acide carbonique, de l'alcool et des caséones.

4° De l'analyse bactériologique résulte que le leben renferme différents microorganismes constitués surtout par des ferments de la caséine et de la lactose. Il est utile de faire un choix parmi ces ferments car beaucoup ne donnent que de mauvaises fermentations.

5° Préparation d'un leben par deux procédés :

a). — A l'aide du ferment alcoolique.

b). — A l'aide des ferments alcoolique, lactique et de la caséine.

6° Le leben ainsi préparé est un aliment autant qu'un médicament et il y a lieu de l'employer.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Montpellier, le 13 Juillet 1899.
Le Recteur,
A. BENOIST.

VU ET APPROUVÉ :
Montpellier, le 13 Juillet 1899.
Le Directeur,
G. MASSOL.

PRÉPARATIONS

1. — Rectifier de l'alcool impur et obtenir 1 litre d'alcool à 90°
2. — Un litre de teinture de tournesol rouge (sensible).
3. — Un litre de teinture de tournesol bleue (sensible).
4. — Nitrate mercurique.
5. — Chlorure d'ammonium pur, 500 gr.
6. — Vinaigre camphré.
7. — Vinaigre Anglais.
8. — Extrait de valériane.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

PASTEUR. — Mémoire sur le ferment appelé lactique (*Annales de chimie et de physique*, 3e série, t. LII, p. 404).

TRABUT. — Botanique médicale.

DINITCH. — Le Képhir. Thèse inaugurale, 1888, Paris.

SAILLET. — Laits fermentés et leurs usages thérapeutiques. Thèse inaugurale, 1886, Paris.

BOURQUELOT (E.). — Les microbes de la fermentation alcoolique du lait : le képhir (*Journal de pharmacie et de chimie*, t. XIII, p. 232).

— — Les Fermentations (1889).

DUCLAUX (E.). — Principes de laiterie.

— — Fermentation alcoolique du sucre de lait (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1887).

— — Sur la différenciation des matières albuminoïdes (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1892).

— — Les laits stérilisés (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1892).

— — Chimie biologique, 1883.

— — Traité de microbiologie, 1898-1899.

GAUTIER (G.). — Chimie biologique, 1892.

KAYSER. — Etudes sur la fermentation lactique (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1894).

— Contribution à l'étude physiologique des levures alcooliques du lactose (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1891).

Manufacture de la Charité. — Montpellier.